Pêches et Océans Canada
Fisheries and Oceans Canada

Sciences des écosystèmes et des océans
Ecosystems and Oceans Science

Secrétariat canadien de consultation scientifique
Avis scientifique 2015/039

Région de la Capitale Nationale

AVIS SCIENTIFIQUE VISANT À ORIENTER LA RECHERCHE AU MOYEN DE LA PLATEFORME BIOMARK DE FLUIDIGM® POUR DÉTECTER LES MICROBES CHEZ LES SAUMONS D'ÉLEVAGE ET SAUVAGES

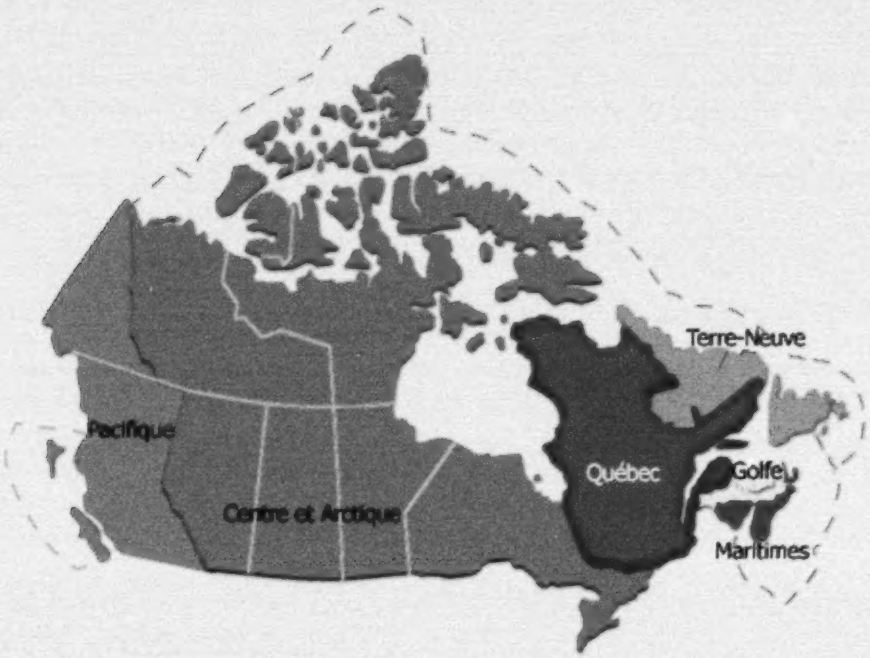

Figure 1. Carte des six régions administratives de Pêches et Océans Canada (MPO).

Contexte

Une initiative stratégique visant la santé du saumon (ISSS) en Colombie-Britannique financée par Genome BC et en partenariat avec Pêches et Océans Canada (MPO) et la Fondation du saumon du Pacifique. Le but de ce projet en plusieurs phases consiste à « recenser les microbes et les maladies potentielles qui pourraient nuire à la productivité et au rendement du saumon (sauvage) de la Colombie-Britannique et déterminer quels échanges peuvent s'effectuer entre le saumon sauvage et le saumon d'élevage ». La réussite de ce projet tient au développement et à l'application d'une nouvelle technologie, la plateforme quantitative de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) BioMark de Fluidigm®, pour détecter la prévalence de douzaines de microbes et le degré de contamination microbienne dans des milliers d'échantillons de tissus de saumons de Colombie-Britannique.

Dans ce processus consultatif, les participants ont évalué la méthode de cette application de recherche, notamment l'évaluation de la sensibilité analytique, la spécificité, la répétabilité et la comparabilité, ainsi que les avantages, les limitations, les incertitudes et les utilisations proposées de cette méthode (y compris la conception et les analyses statistiques) pour les besoins de la recherche déterminée.

Le présent avis scientifique découle du processus consultatif national qui a eu lieu du 2 au 4 décembre 2014 concernant l'Examen de l'évaluation de la plateforme BioMark de Fluidigm pour déterminer son adéquation pour la surveillance microbienne. Toute autre publication découlant de cette réunion sera publiée, lorsqu'elle sera disponible, sur le calendrier des avis scientifiques du secteur des Sciences du MPO.

Juillet 2015

Canada

SOMMAIRE

- Plus de 90 % des jeunes saumons qui migrent des eaux douces vers l'océan mourront avant de retourner vers les eaux douces pour frayer. On a lieu de croire que le taux de mortalité est à son maximum dans les premiers mois en milieu marin; toutefois, il existe un taux de mortalité constant qui s'explique par de nombreux facteurs différents. Étant donné que la majeure partie des connaissances actuelles sur les maladies affectant les saumons découle d'observations sur des poissons d'élevage, l'importance relative des causes infectieuses et non infectieuses chez le saumon du Pacifique migrateur reste en grande partie méconnue.
- L'initiative stratégique visant la santé du saumon (ISSS) en Colombie-Britannique lancée par Genome BC est en cours de déploiement et son rôle stratégique consistera à détecter les microbes et les maladies éventuelles qui en découlent et qui pourraient nuire à la productivité et au rendement du saumon de C.-B., à son évolution, ainsi que le rôle que pourraient jouer les échanges entre le saumon sauvage et le saumon d'élevage. Ce projet de recherche est hautement pluridisciplinaire faisant intervenir plusieurs domaines de recherche à savoir : la génomique, l'épidémiologie, l'histopathologie, l'immunologie, la virologie, la parasitologie, l'écologie du saumon et la bioinformatique. Le projet sera réalisé en quatre phases (étapes) séquentielles.
- Le projet ISSS porte surtout sur les microbes reconnus à l'échelle mondiale et dont on sait qu'ils occasionnent des maladies chez les saumons (ou qui sont liés à des infections opportunistes des poissons immunodéprimés) ou dont on soupçonne qu'ils les occasionnent. Il a recours à une méthode génomique pour identifier et vérifier les microbes présents sur les poissons à nageoires sauvages et d'élevage (écloseries fédérales et exploitations salmonicoles) en Colombie-Britannique au Canada. Dans les phases ultérieures du projet, on mènera des études de provocation sur les microbes dont on convient qu'ils pourraient nuire le plus au saumon sauvage. Ces études nous permettront de mieux comprendre les conditions dans lesquelles, le cas échéant, les microbes provoquent des maladies.
- Le champ d'application de ce processus du Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS) en est à la **phase 2a** de ce projet dont le principal objectif défini consiste à évaluer la sensibilité, la spécificité et la répétabilité des essais destinés à analyser de manière quantitative la présence et la quantité de microbes simultanément dans plusieurs échantillons à l'aide d'une plateforme microfluidique à haut rendement (plateforme BioMark de Fluidigm®, ci-après désignée par BioMark). Cette technologie utilise une étape d'amplification spécifique cible (ASC), dont les effets ont été évalués dans le présent rapport.
- Il n'existe aucune norme minimale convenue sur les caractéristiques de rendement analytique comme l'énonce l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). L'étape 1 de l'évaluation de l'OIE (tests diagnostiques) est vraisemblablement l'analogue le plus proche; toutefois, l'OIE ne fournit pas expressément de lignes directrices sur la validation des essais multiplexes (p. ex., l'amplification spécifique cible) ou les nouvelles technologies (p. ex., la plateforme BioMark).
- Dans le présent contexte, les essais réalisés sur la plateforme BioMark visent à effectuer des travaux de recherche (objectif qui ne figure pas dans ceux énumérés par l'OIE mais qui n'en est pas non plus exclu). Par conséquent, l'hypothèse conceptuelle vérifiable pouvant être évaluée sur le plan statistique (nul contre autre) dans le cadre de ce projet est l'estimation et la comparaison de la prévalence des microbes et des pathogènes et elle est donc probablement la plus proche des objectifs énumérés par l'OIE.

- Concernant les maladies réglementées par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) ou répertoriées par l'OIE, il a été discuté et convenu d'une procédure de déclaration à l'ACIA.
    - L'équipe de projet (laboratoire) a recours aux essais recommandés par l'OIE, si ils sont disponible.
    - Si elle soupçonne que les échantillons renferment un agent pathogène à déclaration obligatoire, l'équipe de projet (laboratoire) suivra les directives de déclaration obligatoire de l'ACIA applicables aux laboratoires de recherche le cas échéant (directive : *Avis de déclaration obligatoire de maladies des animaux aquatiques à déclaration obligatoire par les chercheurs*).
    - Si on soupçonne que les échantillons renferment un agent pathogène répertorié par l'OIE sans déclaration obligatoire auprès de l'ACIA (ou qui ne doit pas être déclaré immédiatement à l'ACIA), l'ACIA doit être avisée selon la procédure déterminée pour un laboratoire de recherche.
    - Si les tests de dépistage confirment la présence d'agents pathogènes à déclaration obligatoire, les résultats doivent être communiqués à l'ACIA dans les 24 heures suivant la détection, et ces résultats préliminaires ne doivent pas être communiqués en dehors de l'équipe de projet. C'est à l'ACIA que revient la responsabilité sur le plan réglementaire de confirmer la présence de toute maladie à déclaration obligatoire au Canada.
    - L'équipe de projet (laboratoire) communiquera avec l'ACIA pour obtenir des clarifications, au besoin.
    - L'équipe de gestion du projet ISSS ne sera informée qu'après la tenue d'une enquête par l'ACIA (le cas échéant).
- Conformément au mandat, cet examen du SCCS a analysé : la sensibilité analytique, la spécificité et la répétabilité des essais microbiens sur la plateforme BioMark; la comparabilité des résultats des essais entre les plateformes BioMark et ABI 7900; les effets de l'amplification spécifique cible; les avantages, les limitations, les incertitudes et les emplois proposés de cette méthode.
- *Sensibilité des essais* : Pour presque tous les essais BioMark, une limite de détection des échantillons soumis à une étape d'enrichissement par ACS était de un à dix exemplaires par chambre, identiques à la limite de détection du matériel de départ. La valeur admissible du cycle seuil (Ct) associée à la limite de détection se situait entre 27 et 29. Les échantillons témoins dont le résultat au test s'est avéré positif ont été recueillis à partir de sources aussi fiables que possible et ont affiché des résultats satisfaisant pour la plupart des 47 essais; pour deux virus ISAV7 et IPNV, les essais n'ont pas décelé toutes les variantes des souches, ce qui correspond aux résultats obtenus sur d'autres plateformes et ce à quoi on s'attendait d'après le degré d'homologie. Les auteurs de l'examen ont laissé entendre qu'il se pouvait également que certaines variantes de souches de microbes d'origine bactérienne ne se trouvent pas dans les échantillons testés, et qu'ils ne soient pas détectables par des analyses *in silico*.
- *Spécificité des essais* : 13 essais sur des virus et 12 sur des bactéries ont mis en évidence une spécificité élevée par rapport à l'ensemble des espèces étroitement apparentées. Les essais portant sur 22 parasites étaient en grande partie spécifiques, mais certaines espèces plus éloignées ont affiché un résultat positif dans certains échantillons de tissus vraisemblablement en raison d'une coinfection par plusieurs espèces de parasites. Tandis

que les auteurs montrent que pour ces paires de microbes, la codétection n'était pas la norme (ce qui concorde avec une coinfection plutôt qu'avec une hypothèse d'amplification croisée), les responsables de l'examen ont pensé que le séquençage des nucléotides apporterait une meilleure preuve qu'il s'agissait d'infection mixte.

- Dans l'ensemble, on n'a enregistré aucun écart entre la sensibilité ou la spécificité évaluée pendant les essais et celle escomptée sur d'autres plateformes, tout écart d'une spécificité analytique à 100 % n'empêchait pas la résolution de microbes connus chez les saumons (à une exception près) et les mesures du rendement analytique se situaient dans une fourchette acceptable pour la plupart des essais.
- *Répétabilité des essais* : on a analysé la répétabilité de vingt-six (26) microbes endémiques au travers de 240 échantillons de saumon provenant de Colombie-Britannique. La répétabilité (dans un réseau dynamique) et la reproductibilité (à travers des réseaux dynamiques) ont fait l'objet d'un examen. On a évalué l'état binaire de concordance (positif/négatif) entre les réplicats et il s'est avéré qu'il était de 98 %, globalement.
- *Comparaison des plateformes* : L'étude a comparé le rendement de BioMark et d'ABI 7900HT au moyen des concentrations d'amorce et de sonde recommandées pour la plateforme BioMark, et elle a obtenu des résultats comparables pour 22 essais disponibles. Ces conditions n'ont pas été optimisées individuellement pour des plateformes conventionnelles de PCR quantitative.
- *Effet de l'ASC* : le recours à l'ASC permet d'accroître la sensibilité de détection de la cible et il est nécessaire en raison du petit volume décidé inhérent à toute plateforme microfluidique (7 nl pour le tableau dynamique 96.96). Ce volume représente environ 1/1000 le volume d'une plateforme conventionnelle de PCR quantitative (qPCR). La valeur admissible du cycle seuil et la limite de détection par chambre pour l'amplification spécifique cible (ASC) et l'amplification non spécifique cible (ANSC) sont les mêmes, respectivement Ct de 27 à 29 et environ de 1 à 10 exemplaires, mais le matériel de départ doit comporter un minimum d'environ 1000 exemplaires par µl si l'ASC n'est pas appliquée. En gros, l'ASC enrichit les produits ciblés d'environ 1000 fois. Mis à part l'effet de la limite de détection sur le matériel de départ, aucun biais récurrent n'a été recensé quant à l'abondance relative des cibles. De plus, on n'a observé aucune différence importante entre les fréquences de faux résultats positifs dans l'amplification spécifique cible (ASC) et non spécifique cible (ANSC) dans l'ensemble des essais, ce qui laisse supposer que l'étape d'enrichissement n'a eu aucun effet sur la sensibilité ni sur la spécificité des essais. L'enrichissement ciblé par ASC n'a pas eu d'effets importants sur la répétabilité et la reproductibilité ni sur les résultats individuels (positifs/négatifs). Dans l'ensemble, la répétabilité s'est avérée bonne à excellente pour la plupart des essais et se trouvait dans les fourchettes observées sur d'autres plateformes.
- *Forces et faiblesses* : un certain nombre de *forces* ont été recensées, notamment des avantages quant à : la profondeur du champ d'application; la détection de coinfection; le coût par test; le gain de temps; l'efficacité; la flexibilité; le caractère extensible; une meilleure définition des objectifs; la sensibilité analytique; l'interchangeabilité; les exigences limitées par rapport au tissu; la mise à niveau permettant de faciliter le séquençage de la PCR; évaluation simultanée de la qualité de l'ARN; la détection d'une deuxième sonde; utilisation d'échantillons non létaux. Inversement, un certain nombre de *faiblesses* ont également été recensées notamment : la mauvaise qualité de la courbe pour certains essais; les exigences accrues en matière de formation; le coût élevé initial des instruments; le volume de données et le niveau d'analyse requis (« mégadonnées »); le besoin d'améliorer les algorithmes des logiciels; un instrument mieux adapté aux études plus vastes et aux ensembles de données

plus grands; la prudence dans l'interprétation des résultats. Voir la rubrique *Évaluation* pour obtenir de plus amples explications sur ces points.

- *Incertitude* : un certain nombre de sources d'incertitude ont été répertoriées dans la méthode analytique notamment : le recours à des gBlocks pour les espèces étroitement apparentées; l'utilisation d'échantillons de tissus comme témoins positifs, ce qui peut améliorer les chances de détection de coinfection lorsque plusieurs microbes sont évalués en même temps; le regroupement d'échantillons témoins (par virus, bactéries et parasites) dans le cadre des études de spécificité; le recours à une seule dilution en série (sans évaluation de la variation d'ordre technique dans l'exactitude du pipettage). Ces limitations sont abordées plus en détail dans la rubrique *Évaluation* accompagnées des recommandations connexes.
- Cet examen par les pairs conclut que ce projet de recherche peut passer à la phase 2b. Toutefois, l'avis scientifique contient plusieurs recommandations concernant l'amélioration à apporter à la méthodologie expérimentale, aux procédures de laboratoire et au document de travail connexe (Document de recherche) qui doivent être appliquées. Vous trouverez de plus amples détails dans la rubrique *Évaluation* du présent rapport, mais parmi ces recommandations, on trouve :
    - Les mêmes essais ont été réalisés plusieurs douzaines de fois afin d'obtenir la limite de détection et la linéarité des essais pour chaque conception d'amorce ou de sonde; toutefois, ils ont été effectués au moyen d'une seule dilution en série de témoins positifs artificiels. Les auteurs ont réussi à démontrer l'exactitude de la prise de mesures dans un seul échantillon pour chaque point, notamment l'effet de six réactions indépendantes d'ASC; cependant, ils n'ont pas inclus l'évaluation des écarts possibles dans la manipulation des liquides (pendant la préparation de la dilution en série de l'ASC). Pour complètement remédier à la variabilité inhérente, il est recommandé d'évaluer la variabilité entre les témoins en utilisant plusieurs dilutions en série préparée séparément.
    - Tous les microbes détectés lors de la comparaison avec les échantillons de témoins positifs autres que ceux ciblés doivent faire l'objet d'un séquençage d'ADN à des fins de confirmation. Il est préférable pour le séquençage de cibler un autre gène (PCR classique ou par amorces incluses) permettant ainsi de distinguer les réactions croisées éventuelles des coinfections. Un séquençage similaire peut être réalisé sur un sous-ensemble d'échantillons de terrain testés afin de confirmer ou de valider la spécificité associée aux études de surveillance de microbes.
    - Afin de garantir la même efficacité de détection (c'est-à-dire les mêmes valeurs Ct), il faut comparer les résultats sur les deux plateformes en utilisant les échantillons d'ASC dans les conditions prescrites pour les deux (p. ex. une température d'hybridation de 60°C pour toutes les amorces et les sondes). Cette comparaison devrait idéalement se faire au moyen de véritables échantillons positifs (c'est-à-dire sans gBlocks) dans la mesure du possible.
    - Il est fortement recommandé de disposer d'un cadre permettant d'orienter l'interprétation des observations de recherche (p. ex., méthode de notation). Il faudrait également tenir compte des conséquences plus vastes qu'auront les observations potentielles et de la façon dont elles seront communiquées aussi bien à l'interne (au sein du ministère) et plus largement à l'externe (le public). Aussi bien les organismes de réglementation que les décideurs pourront tous deux grandement tirer parti d'un cadre uniforme d'interprétation des résultats de projets.

- Afin de tenir compte de l'incertitude de certains procédés d'essai, il est recommandé de mettre en place un système de gestion de la qualité qui permettrait d'assurer la mise en place de méthodes et de vérifications de processus; la vérification et le calibrage du matériel et des instruments; la mise en place de réactifs critiques; l'introduction de nouveaux essais. En outre, chaque aspect de l'assurance ou du contrôle de la qualité (AQ/CQ) doit prendre en compte les risques recensés et les atténuer (p. ex., des procédures opérationnelles normalisées ou un manuel de contrôle de la qualité).
- Il est recommandé d'effectuer une vérification de l'efficacité de l'étape de nettoyage après l'ASC.
- Il est recommandé de vérifier la spécificité entre les regroupements de microbes (virus, bactéries et parasites) en utilisant des échantillons réels et en excluant les tissus et les gBlocks dans l'ensemble des essais.
- Il est recommandé de tester la robustesse des gains d'efficacité des Ct calculés. Pour ce faire, on peut changer les gains d'efficacité (manuellement dans les formules) et vérifier les effets sur les Ct calculés.

RENSEIGNMENT DE BASE

Plus de 90 % des jeunes saumons qui migrent des eaux douces vers l'océan mourront avant de retourner vers les eaux douces pour frayer. On a lieu de croire que le taux de mortalité est à son maximum dans les premiers mois en milieu marin; toutefois, des individus continuent de disparaître de la population au fil du temps en raison de nombreux facteurs différents, notamment les maladies et d'autres causes variées (p. ex., la nutrition, l'environnement, la prédation, l'exploitation, etc.). Les connaissances actuelles sur les maladies infectieuses chez les saumons découlent presque exclusivement d'observations réalisées sur des poissons d'élevage (aussi bien dans les écloseries que dans l'aquaculture). En conséquence, on connaît relativement bien les pathogènes et les maladies cliniques qui touchent le saumon dans les écloseries en eau douce et les parcs en filets en eau de mer, mais on connaît beaucoup moins bien les pathogènes qui affectent le saumon sauvage du Pacifique dans l'océan. Motivés par le besoin de combler cette lacune et conscients que les nouvelles méthodes génomiques peuvent offrir une profondeur de résolution qui n'existait pas auparavant, les auteurs ont mis sur pied avec la Fondation du saumon du Pacifique et Genome British Columbia un projet en phases destiné à décrire les microbes (définis comme des virus, des bactéries, des champignons et des micro-organismes protozoaires) chez les saumons de Colombie-Britannique et de recenser ceux qui pourraient influencer la productivité et le rendement des populations de saumons sauvages et d'élevage.

Le projet porte principalement sur les microbes dont on reconnaît à l'échelle mondiale provoque des maladies cliniques (ou qu'ils sont associés à des infections opportunistes chez les poissons immunodéprimés) chez les salmonidés, et il a recours à des méthodes génomiques pour répertorier et vérifier les microbes que l'on peut détecter à l'heure actuelle chez les poissons sauvages et d'élevage (écloseries fédérales et exploitations salmonicoles) en Colombie-Britannique au Canada. Dans les phases ultérieures du projet, on cherchera à mettre sur pied des études de provocation sur les principaux microbes susceptibles de nuire le plus au saumon sauvage afin de mieux comprendre les conditions dans lesquelles, le cas échéant, ces microbes peuvent provoquer des maladies. Le but stratégique défini dans le cadre du projet consiste à « recenser les microbes et les maladies potentielles qui pourraient nuire à la productivité et au rendement du saumon (sauvage) de la Colombie-Britannique et déterminer les échanges qui peuvent s'effectuer entre le saumon sauvage et le saumon d'élevage pendant l'évolution de ces microbes ».

Pour l'ensemble du projet, les quatre phases séquentielles ont été définies comme suit :

La **PHASE 1 (de 2012 à 2013)** prévoit l'établissement d'un programme d'échantillonnage à grande échelle pour le saumon sauvage, le saumon d'écloserie et le saumon d'aquaculture. L'échantillonnage initial a été réalisé en 2012 et au début 2013, mais il s'étend à d'autres phases et comprend ainsi des données pluriannuelles. Des archives de données sont également disponibles pour le saumon d'élevage et le saumon sauvage de 2008 à 2011, lesquelles ont été recueillies dans le cadre d'un projet antérieur mené par Genome BC.

La **PHASE 2 (de 2013 à 2016)** prévoit la conception, la mise à l'essai et ultimement l'application d'une technologie génomique originale visant à déterminer quels microbes associés à des maladies touchant les saumons du monde entier sont présents chez le saumon sauvage et le saumon d'élevage de la Colombie-Britannique. Cette phase fait également intervenir des études épidémiologiques reposant sur des données sur la répartition des microbes et la prochaine génération de séquençage, l'histopathologie et des études génomiques fonctionnelles afin de répertorier les microbes qui présentent la probabilité la plus élevée d'affecter les poissons sauvages.

La **PHASE 3 (de 2015 à 2017)** sera axée sur les microbes recensés pendant la phase 2, plus particulièrement ceux n'ayant pas fait l'objet de recherches approfondies en Colombie-Britannique et posant le plus grand risque de maladie pour le saumon sauvage. Des études de provocation en laboratoire seront menées dans le but d'évaluer les conditions propres aux microbes qui sont associées à l'apparition de maladies chez le saumon du Pacifique. Seront aussi menées des études additionnelles visant à évaluer les dynamiques de transmission de microbes précis. Les données génomiques sur la réponse et l'adaptabilité de l'hôte à la maladie seront intégrées à ses études. Cette phase pourrait être financée par Genome Canada et ferait intervenir une contribution plus importante des laboratoires universitaires.

La **PHASE 4 (de 2017 à 2018)** prévoit la présentation aux organismes de gestion de rapports de recherche et d'exposés portant sur l'utilité potentielle des méthodes mises au point et de l'application des résultats obtenus à des activités de travaux de recherche ultérieurs sur la détection des microbes.

Il est important de noter que les deux premières phases du programme de recherche s'intéressent principalement aux microbes plutôt qu'aux maladies. Ce dernier point sera l'élément central de la troisième phase du programme ISSS. L'adoption d'une telle approche s'explique par le fait que l'on a rarement, voire jamais, l'occasion d'observer un poisson sauvage mourir, en particulier dans l'océan; il serait donc rare d'obtenir des échantillons de poissons sauvages dans les derniers stades d'une maladie. Toutefois, étant donné qu'un poisson peut être porteur de nombreux microbes avant (et après) l'apparition d'une maladie clinique, il est possible de recenser certains des agents pathogènes infectieux dans un échantillon représentatif de poissons sauvages. En adoptant une telle approche, il est admis que bien que de nombreux microbes peuvent provoquer des maladies chez les salmonidés sauvages, toutes les maladies ne sont pas engendrées par des microbes (remarque : le programme porte surtout sur les maladies infectieuses) et tous les microbes ne causent pas forcément de maladies. Il est également reconnu que le rendement diagnostique de la détection simultanée d'un grand nombre de microbes, notamment dans les populations de poissons sains, sera très difficile à quantifier et ne reflétera pas nécessairement une infection active (c'est-à-dire que l'essai détecte des composants du microbe qui ne correspondent pas forcément à des organismes vivants), limitant ainsi l'interprétation des résultats pour faire des comparaisons. C'est la raison pour laquelle à la phase 2 du programme, les auteurs ont fait attention à ne pas partir du principe que tous les microbes détectés chez les saumons de Colombie-Britannique provoquaient des maladies et engendraient la mort. Toutefois, les auteurs affirment qu'en recensant les microbes que l'on peut détecter dans les populations de saumon sauvage du Pacifique et en limitant les études principalement aux microbes dont on sait qu'ils sont associés à des maladies ou un taux de mortalité dans diverses espèces de saumon dans le

monde, il est possible de commencer à définir des types de maladies dont ils peuvent être affectés et de définir des modèles de distribution temporelle et spatiale de microbes sélectionnés. De plus, les analyses statistiques qui font apparaître un contraste entre la prévalence des microbes et le degré de contamination microbienne au sein des populations de saumon, les stades du cycle de vie et les années peuvent également mettre en évidence l'interaction écologique de microbes spécifiques, ou de séries de microbes, avec l'évolution de la population de saumons.

La science du génome est la pierre angulaire par laquelle ce projet va étudier les microbes affectant les saumons et les processus relatifs à la maladie. Tout au long du projet, trois méthodes génomiques seront utilisées :

1) une plateforme de micro fluidique de PCR quantitative (BioMark) destinée à la détection de microbes;
2) un séquençage à haut rendement destiné à la confirmation de la séquence du microbe, aux études épidémiologiques et à la découverte de nouveaux microbes (essentiellement viraux);
3) l'établissement du profil l'expression des gènes sur de microréseaux et la plateforme BioMark afin d'évaluer les signatures transcriptionnelles associées à l'état de porteur du microbe (phase 2) et à la maladie (phase 3).

Concernant la détection de microbes, le projet a recours à une combinaison d'essais publiés et nouvellement mis au point pour un nombre allant jusqu'à 45 microbes uniques dont on soupçonne ou dont on sait qu'ils sont associés à des maladies ou à une baisse de la qualité marchande (p. ex., *Kudoa*) du saumon dans le monde.

Description de la plateforme BioMark de Fluidigm

La plateforme BioMark utilise des microfluides permettant augmenter le nombre d'échantillons et d'essais que l'on peut entreprendre simultanément, réduire le volume des échantillons de 1000 fois et accroître la vitesse et la sensibilité des essais par rapport à la plateforme ABI 7900, ce qui diminue considérablement l'utilisation des réactifs et les coûts. Le réseau dynamique de la plateforme réalise simultanément 96 essais sur 96 échantillons, générant 9 216 points de données par traitement. Des évaluations antérieures de BioMark par rapport à l'ABI 7900 ont montré que la fourchette de détection linéaire et la précision des mesures des essais répétés sont similaires entre les deux instruments. De plus, il a été montré récemment que la plateforme BioMark était en mesure de détecter un nombre d'exemplaires d'ADN 1,25 fois supérieur (lorsqu'on effectue de 18 à 40 essais répétés), soit un résultat supérieur à la plupart des autres plateformes. Les essais réalisés sur cette plateforme et l'utilisation des contrôles adaptés sont identiques à ceux que l'on réaliserait sur d'autres plateformes de PCR quantitative.

L'élément majeur qui distingue la BioMark des autres plateformes qPCR est le très petit volume d'échantillons utilisé (0.007µl en comparaison de 6-10µl pour les plateformes traditionelles). Ces petits volumes requièrent que l'on utilise une étape d'amplification cible spécifique (ASC) afin d'enrichir les séquences d'intérêt ciblées. Ce protocole a fait l'objet de nombreuses évaluations dans les études transcriptionnelles des gènes; toutefois, la présente analyse offre une analyse poussée des effets qu'il pourrait avoir sur la quantification et la spécificité relatives des essais microbiens.

Il faut noter que la plateforme BioMark a été développée pour des pathogènes humains et le diagnostic de maladies dans quelques entreprises de biotechnologie aux États-Unis (une autre étude du genre provenant du Japon a déjà été publiée). Il est également possible que le système BioMark puisse, une fois que les niveaux adéquats de validation auront été atteints, être utilisé de manière plus large pour établir un diagnostic de la santé des poissons et des diagnostics réglementaires, ce qui ferait économiser énormément de temps et d'argent dans l'application des

essais moléculaires : le prix que coûte le traitement de 90 essais en double de 90 échantillons de poissons sur l'ABI 7900 est identique au prix que coûte le traitement de 48 essais en double de 90 échantillons de poissons sur la BioMark avec une durée identique à celle de la réalisation d'un seul essai. La BioMark est capable de réaliser de trois à quatre traitements par jour selon les heures normales de travail, ce qui représente jusqu'à 360 individus pour 47 essais microbiens dupliqués.

ÉVALUATION

En vertu du cadre de référence établi, cet avis scientifique fournit un examen et une analyse de la méthodologie proposée (y compris une analyse de conception et une analyse statistique) afin d'évaluer les méthodes génomiques utilisées à grande échelle pour déterminer et vérifier les microbes qui peuvent actuellement être détectés dans les poissons à nageoires sauvages et d'élevage (écloseries fédérales et exploitations salmonicoles) en Colombie-Britannique, au Canada. Il comprend les *forces* et les *faiblesses* décrites ci-dessous. Une lacune des analyses présentées est que l'évaluation a été menée à l'aide d'un instrument BioMark, et elle n'a pas examiné la variabilité au sein d'un échantillon représentatif d'instruments similaires.

Forces

1) **Précision de la portée** : La détermination des résultats de nombreux essais simultanés peut augmenter la précision des évaluations de microbes, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension du rôle des coinfections sur l'évolution de la maladie.
2) **Coût** : Le coût par essai est plus faible si plus de quatre (4) essais sont nécessaires. On a réalisé que le coût est sensiblement le même pour analyser 96 échantillons au moyen de l'instrument BioMark que pour analyser 4 échantillons sur une plateforme PCR quantitative traditionnelle. Toute allégation de rentabilité doit également tenir compte du prix d'achat de départ (considérable) d'un instrument BioMark (environ 250 000 $).
3) **Économies de temps** : Le chercheur principal a indiqué qu'un technicien peut effectuer plus de 27 000 réactions en chaîne de la polymérase en deux jours à partir d'acides nucléiques.
4) **Efficience** : Tous les essais sont réalisés dans un format à 96 puits, ce qui permet une préparation robotisée simple et efficiente des échantillons.
5) **Flexibilité** : La composition des essais de microbes peut facilement être modifiée pour respecter les exigences de différentes applications; des précisions peuvent inclure l'analyse des essais par environnement, tissu, espèce ou stade biologique, entre autres. De plus, il existe différents formats de tableau dynamique qui peuvent permettre moins d'essais sur un plus grand nombre d'échantillons (tableau 24.192) ou moins d'essais sur moins d'échantillons (tableau 48.48).
6) **Expansibilité** : L'incorporation d'essais supplémentaires sur les microbes ou même de biomarqueurs hôtes est facile, même si on peut souhaiter le faire dans une amplification ciblée précise distincte.
7) **Précision de l'objectif** : l'équipe du laboratoire de recherche a mis au point et mis à l'essai un large éventail d'essais sur les microbes du saumon de façon à déterminer les microbes détectables dans le saumon de la Colombie-Britannique; il serait plutôt facile de concentrer le développement du typage de souche ou de génogroupe au sein des microbes comme cela a été accompli pour la bactérie *Streptococcus pneumoniae* chez l'humain. On pourrait aussi mettre au point un groupe de parasites branchiaux qui comprendrait des agents infectieux et ceux responsables de la prolifération d'algues nuisibles.

8) **Sensibilité analytique** : Les résultats des analyses effectuées dans le cadre de ce projet sont conformes aux publications scientifiques récentes et ils indiquent que la plateforme BioMark est plus sensible que d'autres plateformes, puisqu'elle permet de détecter avec fiabilité de 3 à 10 copies par µl de réactif pour la plupart des essais, comparativement à un intervalle de 30 à 100 copies pour la plupart des plateformes de PCR quantitatives à un seul essai. Même si cette sensibilité accrue n'est pas souhaitable pour tous les diagnostics de maladie (la plateforme n'a pas été évaluée à cette fin, et cet aspect n'a pas été pris en compte dans le présent examen), elle pourrait fournir des renseignements utiles sur la transmission précoce des microbes, les états de porteur de microbes et l'évaluation des microbes dilués présents dans la colonne d'eau ou les sédiments.

9) **Interchangeabilité des plateformes** : L'instrument BioMark utilise les mêmes essais que ceux mis au point pour toute plateforme de PCR quantitative, qu'il s'agisse de TaqMan, comme c'est le cas ici, de SYBR, d'EVA et d'autres.

10) **Exigences limitées en matière de tissus** : Étant donné les très petits volumes d'essai (0,007 µl), des centaines d'essais peuvent être effectués à l'aide de l'instrument à partir d'aussi peu que 1 µg d'acides nucléiques. Cette caractéristique permet l'utilisation d'échantillons non destructifs et un échantillonnage de très petits spécimens. L'équipe du laboratoire a utilisé la plateforme avec un seul filament branchial de saumoneau plus petit qu'une tête d'épingle comme réactif pour analyser trois tableaux dynamiques avec des microbes ainsi que des biomarqueurs immunitaires de l'hôte et des biomarqueurs du stress. Cela a permis d'identifier la mise en garde suivante : plus l'échantillon est petit, plus la possibilité de faux négatifs augmente pour les microbes. L'établissement du profil des microbes présents dans l'estomac des microparasites (p. ex., pou du poisson) peut également être réalisé.

11) **Possibilité de mise à niveau pour faciliter le séquençage par PCR** : L'instrument BioMark peut être mis à niveau pour permettre l'analyse du système de tableaux accessibles qui permet le séquençage de tous les produits d'un seul tableau dynamique, avec le codage à barres des échantillons individuels. Cette caractéristique pourrait faciliter le typage de souche rapide et simultané de nombreux microbes si les essais sont conçus à de telles fins ou pourrait fournir une meilleure validation des résultats d'essais quantitatifs.

12) **Évaluations simultanées de la qualité de l'ARN** : Des gènes domestiques sont souvent utilisés comme témoins pour la qualité de l'ARN, et ils peuvent facilement être incorporés dans la série d'échantillons à analyser à l'aide de l'instrument BioMark.

13) **Détection d'une seconde sonde** : L'équipe du laboratoire utilise une stratégie de contrôle positive mise au point par Snow *et al.* qui comprend une seconde sonde comportant une longueur d'onde différente dans le but de faciliter la détection de la contamination d'un grand nombre de copies de matière témoin positive par des constructions artificielles. L'instrument BioMark permet de faire cela sans problème puisqu'il a la capacité de détecter différentes longueurs d'onde simultanément.

Faiblesses

1) **Mauvaises courbes d'amplification pour certains essais** : L'équipe du laboratoire a déterminé un faible pourcentage d'essais qui sont difficiles à évaluer en raison de courbes d'amplification de mauvaise qualité. On a présumé qu'il s'agissait d'un problème lié au logiciel plutôt qu'à la plateforme, mais davantage de tests et de travail avec l'entreprise du logiciel sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Dans certains cas, il a fallu retirer des essais en raison de problèmes en matière de qualité de la courbe.

2) **Exigences accrues en matière de formation** : Étant donné que de nombreux essais sont effectués en même temps, il existe une probabilité élevée d'un besoin accru de formation du personnel technique pour évaluer précisément et simultanément un large éventail d'essais sur des microbes. L'équipe du laboratoire a effectué les premières analyses sans règles d'évaluation propres aux essais, et pour un faible pourcentage d'essais, elle a eu besoin de perfectionnement pour augmenter la répétabilité des résultats de l'essai d'un technicien à l'autre.

3) **Prix d'achat** : Le prix d'achat d'une plateforme BioMark est environ quatre fois plus élevé que celui d'un système ABI 7900 à un seul essai (~250 000 $ CA par rapport à ~60 000 $ CA).

4) **Évaluation de la présence et de la quantité de microbes, non de la maladie** : Tout comme pour n'importe quel essai fondé sur la PCR, un essai moléculaire seul ne permet pas de déterminer si l'animal est malade ou si un microbe cause la maladie.

5) **Volume de donnée et niveau d'analyse (« données volumineuses »)** : La plateforme BioMark a la capacité de produire de très grands volumes de données, ce qui nécessite un niveau tout aussi intense d'analyse et de gestion des données.

6) **Algorithmes logiciels** : L'examen indique que certaines anomalies dans les données pourraient s'expliquer par des déficiences des algorithmes au sein du logiciel fourni par le fabricant. L'équipe de recherche s'engage à travailler en collaboration avec le fabricant pour chercher de possibles améliorations pouvant être apportées au logiciel.

7) **Davantage convenable à d'importantes études, moins utile pour de petits ensembles de données** : L'examen a révélé que la plateforme BioMark pourrait s'avérer plus utile pour des études à grande échelle qui évaluent de nombreux essais parmi de nombreuses espèces plutôt que pour un petit nombre d'échantillons recueillis au sein d'une même espèce.

8) **Interprétation des résultats** : L'examen a révélé que l'interprétation des résultats doit être prudente et devrait être guidée par le contexte biologique et pathologique des espèces et des écosystèmes évalués.

Comparaison de plateformes (BioMark et ABI 7900)

Dans le cadre de la comparaison des deux plateformes de PCR, des échantillons sans amplification spécifique cible ont été testés à l'aide de la plateforme ABI 7900, tandis que les échantillons avec amplification spécifique cible ont été testés à l'aide de la plateforme BioMark. Afin de garantir la même efficience de détection (mêmes valeurs de Ct), la comparaison entre les deux plateformes aurait dû être effectuée à l'aide d'échantillons avec amplification spécifique cible, en respectant les conditions de laboratoires précisées par le fabricant dans les deux cas. Les analyses effectuées sur les deux plateformes étaient conformes aux spécifications du fabricant, respectivement. Afin de régler le problème d'amplification spécifique cible et de fournir un comparateur valide, la limite de détection a été calculée comme le nombre de copies au sein de chaque chambre plutôt qu'à l'aide de la valeur de Ct de l'échantillon. Idéalement, il faudrait effectuer la même comparaison avec des échantillons positifs réels (sans gBlocks), même si cela n'est pas nécessairement possible pour tous les microbes.

L'instrument BioMark accepte la plupart des essais mis au point sur d'autres plateformes conventionnelles de PCR quantitative, y compris ABI 7900 HT par l'ajout d'une étape d'enrichissement ciblé, c'est-à-dire d'amplification spécifique cible. Les auteurs ont comparé le rendement des instruments BioMark et ABI 7900 HT à l'aide des mêmes concentrations d'amorce ou de sonde et ont obtenus des résultats comparables pour les 21 des 22 essais disponibles. Il convient de noter que les conditions cycliques n'ont pas été optimisées pour la plateforme ABI 7900.

Plateforme BioMark

Comme la plateforme BioMark fait encore partie des technologies novatrices et émergentes, il existe peu d'occasions d'effectuer des essais complets pour s'assurer que les résultats peuvent être reproduits et transférés d'un laboratoire à l'autre. De plus, il serait très utile de demander au fabricant des essais de validation sur différents instruments.

Vérification, validation et reproductibilité du rendement

L'examen du rapport par les pairs recommande fortement un programme permanent de vérification du rendement de l'équipement et de validation des résultats. Même s'il s'agit d'un projet de recherche, les laboratoires utiliseront probablement ces mesures de rendement pour évaluer la mise en œuvre des mêmes essais ou d'essais semblables. Dans le cadre du programme d'assurance de la qualité/contrôle de la qualité, la plateforme et le matériel connexe (par exemple, pipettes, appareils de PCR, BioMark HD, balances, dispositif de chargement de puce BioMar, etc.) devraient être calibrés régulièrement.

Il convient de noter que même si le document de recherche connexe indique qu'il s'agit d'une étude d'évaluation de la plateforme BioMark en tant que telle, il s'agit plutôt de l'évaluation d'un seul instrument et non de l'ensemble de la « plateforme ». Pour alléguer avoir validé la plateforme, il faudrait évaluer les caractéristiques de rendement des essais sur un certain nombre d'instruments identiques. Cette évaluation est importante parce que le rendement des essais sera seulement aussi bon que la capacité du fabricant à produire des instruments et des produits consommables normalisés de qualité.

La conception expérimentale peut être renforcée par la présentation de la reproductibilité des données à l'aide de plus de six tableaux dynamiques. De plus, le rapport serait meilleur s'il démontrait si les différents tableaux dynamiques utilisés dans l'étude provenaient du même lot de fabrication ou de lots de fabrication différents. Idéalement pour évaluer pleinement le système, il vaudrait mieux obtenir une mesure de reproductibilité (et donc de rendement) à partir de différents lots de fabrication d'un réactif aussi essentiel.

Dilution en série, limite de détection et valeur seuil de Ct

Pour chaque conception d'amorce ou de sonde, un certain nombre d'essais ont été effectués pour évaluer la limite de détection et la linéarité des essais. La plupart des essais ont révélé un rendement élevé sans modifications aux conditions fixes des essais (par exemple, les concentrations des amorces d'amplification ou des sondes et le profil cyclique thermique, conformément aux directives du fabricant). Cependant, ils ont été effectués à l'aide d'une seule dilution en série de témoins positifs artificiels, avec une réplication importante (40x) parmi les réactions d'amplification spécifique cible et des tableaux dynamiques. Toutefois, un réplicat n'est pas nécessairement suffisant pour estimer les caractéristiques de rendement du ou des essais, en particulier parce que la qualité d'une dilution en série peut avoir des répercussions importantes sur l'efficacité du travail expérimental subséquent (par rapport au déroulement du travail « en aval »).

Les résultats de la conception de l'étude (c'est-à-dire une seule dilution en série) par rapport à la limite de détection peuvent avoir un certain nombre de répercussions en aval, y compris l'établissement du seuil de Ct (étant donné que le seuil est fondé sur la limite de détection) et la spécificité analytique (étant donné que la spécificité analytique est fondée sur le seuil de Ct). Certaines hypothèses ont été avancées à propos du seuil de Ct selon lesquelles il serait utilisé pour le déroulement du travail en aval et pour guider l'évaluation des échantillons positifs et négatifs. Il a été constaté qu'une option du logiciel Fluidigm permet de choisir une valeur de Ct inférieure à 40. Toutefois, des questions restent en suspens à propos de la façon de choisir le nombre de cycles et de l'utilisation du seuil de Ct pour guider l'évaluation.

Mesures d'assurance de la qualité/contrôle de la qualité (AQ/CQ) :

Afin de tenir compte de l'incertitude de certains processus du déroulement du travail, on suggère de prendre en considération l'établissement d'un programme de contrôle de la qualité pour fournir une vérification des méthodes, des processus et des réactifs essentiels ainsi qu'une calibration des pipettes, etc. Chaque aspect du processus devrait être pris en considération afin de réduire les risques et ces processus devraient faire partie d'une procédure opérationnelle normalisée et d'un manuel global de qualité. Il faut également prendre en considération le fait que le rendement analytique des essais peut être influencé par des variations dans les lots du fabricant, y compris les réactifs, Taqman, etc.

Le déroulement du travail est complexe et comporte plusieurs niveaux. Par conséquent, il comprend de nombreuses étapes différentes qui nécessitent davantage de temps et des manipulations qui peuvent créer des erreurs potentielles (par exemple, la synthèse de l'ADNc, l'amplification spécifique cible, l'injection sur la plaque, la PCR). De plus, un processus plus complexe nécessite plus de mesures d'AQ/CQ pour garantir la qualité à chaque étape, ce qui entraîne une augmentation des coûts et du temps requis. Finalement, il a été noté qu'une configuration ou une disposition physique étroite des puces à chambre multiple peut présenter un risque de contamination croisée entre les échantillons et les chambres. Il est possible d'atténuer ce risque à l'aide de la conception du processus.

La procédure ExoSapit (après amplification spécifique cible) a été reconnue comme une étape très importante et un point de contrôle critique. Il serait avantageux de mettre au point une série d'indicateurs d'AQ/CQ pour confirmer les résultats et pour s'assurer que les amorces ne se propagent pas dans la réaction finale. Des essais supplémentaires devraient permettre de s'assurer que toutes les amorces de l'amplification spécifique cible sont complètement consommées.

Coinfections, infections multiples

Dans le cadre de l'analyse de spécificité (en particulier pour le groupe de parasites), il est important d'explorer toutes les zones de risque possible de « faux positifs ». Le séquençage des réactions « faussement positives » potentielles (appelées infections multiples) est donc essentiel pour distinguer les réactions croisées ou les coinfections potentielles. De plus, ce serait une bonne idée d'examiner les résultats pour les échantillons présentant plusieurs parasites apparents afin de déterminer si les parasites présents sont valables selon le cycle biologique de l'échantillon utilisé.

Détection des microbes, infections et maladie

L'examen par les pairs a permis de noter qu'une distinction plus claire devrait être faite entre la détection d'un microbe (agent), l'infection et la maladie. La *détection* d'un agent n'indique pas nécessairement une infection, et l'infection n'équivaut pas à la maladie. Il est très important de clarifier ces distinctions, en particulier parce qu'elles sont liées à l'utilisation de la technologie et à l'interprétation des résultats. De plus, un *diagnostic* est le processus qui permet de déterminer la cause d'une *maladie*; l'établissement d'un diagnostic comprend généralement plus que la simple détermination des causes possibles de la maladie.

Le document de recherche ne devrait renfermer aucune ambiguïté à propos du fait qu'une charge élevée d'infection est une preuve de causalité. Même si la charge de l'agent infectieux est généralement élevée pour une maladie précise, la détection de charges élevées d'un agent qui peut possiblement causer une maladie n'indique pas nécessairement que ce même agent cause la maladie, c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas d'une relation bilatérale.

Sélection des amorces et des témoins

Lorsqu'on effectue des essais pour vérifier la présence d'infections classées comme maladies à déclaration obligatoire par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), il faut utiliser les ensembles d'amorces recommandés dans le *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques*. Les ensembles d'amorces validés de manière analytique pour les segments 7 et 8 qui sont recommandés dans le Manuel de l'OIE n'ont pas été utilisés pour la détection du virus de l'anémie infectieuse du saumon dans le cadre de cette étude. De même, les essais utilisés pour la détection des bétanodavirus ne sont pas ceux indiqués dans le Manuel de l'Organisation mondiale de la santé animale.

La sélection des témoins du virus de l'anémie infectieuse du saumon présente une incongruité apparente; les génogroupes du virus de l'anémie infectieuse du saumon sont fondés sur les analyses phylogénétiques et comprennent deux groupes principaux, les génogroupes européens et nord-américains, ainsi qu'un groupe moins important, le groupe européen-nord-américain. Le groupe européen comprend également trois sous-groupes. Dans le cas présent, le choix des témoins du virus de l'anémie infectieuse du saumon est fondé sur la souche HPR, qui ne correspond pas bien avec les génogroupes. Par conséquent, lorsqu'une grande quantité de témoins est sélectionnée, elle doit représenter les génogroupes et les sous-groupes principaux.

Les essais de phase 2a ont été effectués à une température d'hybridation de 60 °C pour toutes les amorces et les sondes. Certains essais sont tirés de la documentation et la température de renaturation recommandée n'était pas toujours de 60 °C. Il pourrait être avantageux d'adapter des amorces et des sondes de façon à ce qu'elles correspondent à une température de renaturation de 60 °C (pour les essais publiés).

Interprétation des résultats et des constatations et production de rapports

Même si ce projet présente l'avantage d'une connaissance accrue de la présence de différents microbes dans les poissons sauvages et d'élevage, certaines incertitudes demeureront à propos de la signification et de l'importance biologiques et écologiques de tels résultats étant donné le large éventail de microbes examinés. On recommande fortement l'utilisation d'un cadre de travail pour guider l'interprétation de ces résultats; il devrait être établi par l'équipe du projet de recherche en collaboration avec les organismes de réglementation (Agence canadienne d'inspection des aliments et Pêches et Océans Canada). Ce cadre de travail devrait tenir compte des mécanismes de communication de tels résultats au public, y compris les répercussions à plus grande échelle des résultats potentiels.

Pour de nombreux agents mis à l'essai, des agents témoins « naturels » n'étaient pas disponibles. Par conséquent, des témoins positifs synthétiques (gBlocks et plasmides) ont été utilisés pour représenter certaines espèces et souches. Cette méthode est adéquate pour les témoins d'essai positif, mais lorsqu'on utilise de tels témoins comme cibles dans le cadre d'examens de la spécificité, il faut accorder beaucoup d'attention à l'évaluation des résultats et à la production de rapports sur ces résultats. Un gBlock de 1000 bp ne représente généralement qu'une petite partie du génome total (par exemple, environ 0,02 % d'une bactérie type). Par conséquent, on remet en question la pertinence de déclarer 100 % de spécificité lorsque de tels antigènes synthétiques sont utilisés. Les études de telles réactions croisées présentent peu de valeur lorsque des gBlocks sont utilisés, et les résultats devraient être interprétés avec prudence.

Comme il a été indiqué, les études de réaction croisée n'ont seulement été effectuées qu'*au sein* des groupes de microbes principaux (c'est-à-dire virus, bactéries et parasites), mais les analyses auraient dû être effectuées *entre* les différents groupes de microbes. Ces agents ont coévolué avec leurs hôtes depuis des millions d'années, et on observe plusieurs exemples d'échange de gènes entre les groupes au cours de l'évolution. Toutefois, il convient de noter que les évaluations

habituelles des essais ne comportent pas ce degré de complexité (par exemple, de la bactérie au parasite).

L'interprétation biologique et pathologique des résultats obtenus à partir de poisson sain (sauvage ou d'élevage) sera à la fois plus complexe et potentiellement plus importante. C'est-à-dire qu'elle permettra de détecter les agents importants et de déterminer s'ils causent réellement des dommages aux poissons. Il faut également aborder plusieurs questions liées aux poissons sains ou malades, qui sont exprimées comme des lacunes et des mises en garde à l'interprétation des résultats positifs :

- Toutes les infections ne sont pas généralisées; elles peuvent se restreindre à des organes précis. Il faut donc déterminer les organes à tester.
- Faut-il évaluer la pertinence de tester des infections généralisées chez les poissons sains à l'aide du même type d'échantillons que les poissons malades (généralement les organes *internes*)?
- En un sens, il peut être plus pertinent de tester les organes *externes* des poissons sains (comme la peau, les branchies et les intestins). Par contre, de tels échantillons pourraient refléter davantage l'environnement que le poisson. Les analyses métagénomiques de l'eau de mer ont révélé la présence d'énormes quantités et diversités de microbes, et la probabilité de recueillir des produits de réaction croisée des agents de test est importante. Le virus de l'anémie infectieuse HPR0 non virulent, le virus de la septicémie hémorragique virale marin non virulent et plusieurs espèces de réovirus constituent des exemples de formes non-virulentes de virus virulents déterminés ces dernières années.

On recommande fortement la création d'un cadre de travail permettant l'interprétation biologique et pathologique uniforme des résultats. Ce cadre de travail (ou ces protocoles) devra être mis au point par l'équipe de projet de recherche en collaboration avec les décideurs respectifs en matière de gestion et de réglementation.

Application de la détection des microbes (des maladies d'élevage aux scénarios sauvages)

La plupart des maladies infectieuses chez les poissons ont été détectées et sont bien décrites chez les poissons d'élevage. D'un autre côté, les agents choisis pour être inclus dans la phase 2b de cette étude ne sont pas des agents ayant été prouvés comme causant des dommages aux poissons sauvages. La pertinence et la validité de l'extrapolation des scénarios de maladie entre les populations de poissons d'élevage et de poissons sauvages sont incertaines. L'interprétation de tels résultats issus de scénarios comportant des poissons sauvages et d'élevage devrait être effectuée très prudemment pour plusieurs raisons :

- Les poissons d'élevage sont élevés dans des conditions extrêmes, donc ces activités sont généralement très industrialisées et la production est intense, comprenant une grande quantité (et biomasse) d'hôtes dans un espace restreint.
- La maladie dépend de la cause ou de l'agent, de l'hôte et de l'environnement, et le contexte d'élevage ne peut pas être comparé à celui des poissons sauvages. Les maladies observées chez les poissons d'élevage doivent être considérées comme des maladies liées à la production (même si plusieurs d'entre elles peuvent comprendre une composante infectieuse).
- Un facteur de virulence clé est la capacité de transmettre et de maintenir une infection chez les hôtes réceptifs; le nombre et la densité des hôtes disponibles représentent donc un facteur clé.
- Les virus entraînent rarement la mort immédiate de leurs hôtes. Les virus sont des parasites bien adaptés qui ont coévolué avec leurs hôtes depuis des millions d'années et qui ne tuent

généralement donc pas leur hôte. Par conséquent, on estime que les humains sont à tout moment infectés par 5 à 7 différents virus qui ne leur causent aucun dommage.

- Les agents infectieux ont coévolué avec leurs hôtes naturels depuis des millions d'années et sont généralement très specifiques à l'hôte (même si on observe des exceptions comme le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse qui semble être en mesure d'infecter facilement de nouvelles espèces hôtes sans adaptation préalable). D'un autre côté, le virus de la septicémie hémorragique virale, dont le réservoir naturel se trouve, croit-on, chez les poissons marins, doit subir un processus d'adaptation afin d'être en mesure pour causer une maladie chez la truite arc-en-ciel.
- Les maladies infectieuses décrites dans les poissons d'élevage et d'aquaculture sont des infections généralisées (bon nombre sont des septicémies). La question concerne la pertinence de tester de telles infections à l'aide des mêmes approches que chez les poissons malades (c'est-à-dire tester les organes internes). Par conséquent, est-il raisonnable de présumer qu'un poisson sain est atteint d'une infection généralisée ou de septicémie?
- Il n'existe que peu d'exemples de décimations importantes causées par une maladie infectieuse chez les poissons sauvages. L'épidémie de virus de la septicémie hémorragique virale dans le hareng du Pacifique et des Grands Lacs en est un exemple récent. D'un autre côté, les épidémies de maladies infectieuses chez les animaux sont bien connues pour contrôler naturellement les tailles des populations.

CONCLUSIONS ET AVIS

Ce processus d'avis et d'examen par les pairs a révélé plusieurs améliorations recommandées pour la méthodologie expérimentale, les procédures de laboratoire et le document de travail connexe (Document de recherche) qui doivent être pris en charge.

La plateforme BioMark est *ultramoderne* et représente une nouvelle technologie puissante; son potentiel est excellent pour la détection et la surveillance de divers microbes. Cet examen scientifique a constaté que la plateforme BioMark fonctionnait aussi bien que n'importe quelle autre plateforme de PCR quantitative (qPCR), et il n'a relevé aucune lacune pour l'instrument en tant que tel.

En tenant compte de la section *Évaluation* dans le présent rapport, on est arrivé aux conclusions suivantes :

1) Étant donné la méthode utilisée, et d'après l'information transmise, les mesures du rendement analytique semblent se trouver dans une fourchette acceptable pour la majorité des essais pour le projet de recherche proposé.

2) *Sensibilité* : On n'a observé aucune différence importante entre les fréquences d'amplification spécifique cible (STA) et non spécifique cible (non-STA) dans l'ensemble des essais. Les mesures du rendement analytique utilisées ici se trouvaient dans une fourchette acceptable pour la majorité des essais; tout écart par rapport à la spécificité analytique de 100 % n'a pas empêché la résolution des microbes connus du saumon (à une exception près).

3) *Réplication (limite de détection)* : On a utilisé une seule dilution en série pour les essais (et 40 réplicats ont été effectués à partir de cette seule dilution en série). Pour des résultats plus solides, il est recommandé de mettre à l'essai au minimum trois dilutions en série différentes avec cinq réplicats pour chaque dilution. Sans lesdits réplicats, les conclusions relatives à la sensibilité analytique en fonction de l'essai peuvent être problématiques.

4) *Spécificité* : Des échantillons ont été prélevés à partir du plus grand nombre de sources fiables possible, et ils ont montré des résultats satisfaisants pour 13 essais viraux et 12 essais

bactériens. Les essais réalisés pour 22 parasites étaient généralement réussis, mais certains sous-groupes d'essai se sont avérés positifs dans certains échantillons de tissu (sans doute en raison d'une coinfection par plusieurs espèces de parasites). La détermination des séquences nucléotidiques par des segments du génome propres à l'espèce pourrait confirmer l'infection mixte.

5) *Répétabilité* : On a évalué la répétabilité de vingt-six (26) microbes endémiques sur 240 échantillons de saumon de la Colombie-Britannique. La répétabilité (dans un tableau dynamique) et la reproductibilité (dans l'ensemble des panneaux dynamiques) ont fait l'objet d'un examen intense. On a évalué l'état binaire de concordance (positif/négatif) entre les réplicats et il s'est avéré qu'il était de 98 %, globalement. Selon les données présentées, il ne semblait pas y avoir de problème concernant la répétabilité.

6) *Comparaison des plateformes* : L'étude a comparé le rendement de BioMark et d'ABI 7900HT au moyen des concentrations d'amorce et de sonde recommandées pour la plateforme BioMark, et elle a obtenu des résultats comparables pour 22 essais disponibles. Idéalement, il serait mieux d'avoir une comparaison complète des deux plateformes en utilisant les conditions optimales pour chacune d'elles, en notant que les conditions n'étaient pas nécessairement optimales pour l'instrument ABI 7900.

7) D'après le nombre de copies des documents de départ, autres que la limite de détection (LD), l'amplification spécifique cible (STA) n'a introduit aucune erreur systématique.

8) Parmi les 47 essais menés, deux essais ont été ciblés pour le remplacement (virus de la myocardite pisciaire, virus de la septicémie hémorragique virale) et un pour l'élimination (*Yersinia ruckeri*).

9) L'instrument BioMark évalué a montré une aptitude à l'emploi pour ce projet de recherche. On a cerné plusieurs *points forts*, *points faibles* et *incertitudes* potentielles dans les résultats obtenus en utilisant l'instrument BioMark, et il faudrait les résoudre.

Mises en garde concernant les conseils

La méthodologie de recherche actuelle est particulièrement différente d'une démarche s'appuyant sur des hypothèses pour l'enquête relative à la santé des poissons. Par conséquent, elle représente une nouvelle démarche pour l'évaluation de l'impact potentiel des agents pathogènes sur les populations de poissons (c'est-à-dire l'interprétation de l'importance de niveaux potentiellement faibles d'agents pathogènes sur l'état de santé des poissons). Il existe plusieurs avertissements et mises en garde concernant les limites de l'extrapolation desdits résultats de recherche.

Cet examen n'a pas évalué chaque essai microbien en détail au-delà des données fournies dans le présent rapport; il s'agit plutôt d'une évaluation plus générale de la plateforme microfluidique PCR quantitative, et il se limite à une évaluation d'un instrument individuel. Par conséquent, ce rapport consultatif ne formule pas de remarques au sujet de la conception de chaque essai utilisé.

Conformément à l'utilisation d'une plateforme PCR quantitative, l'interprétation biologique et pathologique des résultats et la capacité d'attribution du risque à ces résultats (p. ex., la différenciation entre la présence d'un agent pathogène, d'une infection, et d'une maladie) seront capitales.

Même si le document de travail mentionnait que la plateforme BioMark pourrait être utilisée aux fins de diagnostic, l'étude ne comprenait pas d'évaluation de cette application potentielle, et ce n'était pas le but de ce processus d'avis scientifique.

Sources d'incertitude :

Les différentes sources d'incertitude et des recommandations de recherche pertinentes ont été décrites dans les sections appropriées du présent avis scientifique (voir la section *Évaluation*), le compte rendu de la réunion d'examen par les pairs, et le Document de recherche connexe.

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS

Avis de non-responsabilité : Même si bon nombre de ces définitions peuvent être appliquées universellement, d'autres sont propres au contexte de la présente étude de recherche, donc on doit être prudent. Par exemple, la définition de *répétabilité* serait différente dans d'autres études, car elle s'applique habituellement au processus tout entier (p. ex., on commence par l'échantillon qui serait divisé puis traité deux fois).

Terme	Définition
ABI 7900HT™	Plateforme PCR quantitative standard pour la quantification des microbes utilisée dans le monde entier et fabriquée par Applied Biosystems.
ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments.
ADNc	L'ADN complémentaire est l'ADN produit à partir du modèle ARNm et de la transcriptase inverse d'une enzyme.
Amplification non spécifique cible (non-STA)	Méthode habituelle de PCR sans l'étape d'amplification cible précise Voir STA.
BioMark^{MC}	La plateforme microfluidique validée dans le présent rapport réalisée par la société Fluidigm corporation.
BLAST	L'outil BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool en anglais), outil de recherche élémentaire d'alignement local, est un algorithme pour comparer les données des séquences primaires de nucléotides. Ce programme, lorsqu'il reçoit une interrogation de l'ADN, renvoie les séquences d'ADN les plus semblables à partir de la base de données d'ADN précisée par l'utilisateur.
BLUP	Méthode BLUP d'Henderson (méthode de comparaison directe)
CHSE	Les cellules d'embryons de saumon quinnat constituent une lignée cellulaire offerte sur le marché obtenue à partir du saumon quinnat du Pacifique. Tandis qu'elles sont largement utilisées pour mettre en culture des virus, le laboratoire de recherche a utilisé l'ARN exprimé dans les cellules CHSE exemptes de virus comme un procédé par ajout connu pour les clones APC et les fragments gBlocks pour fournir une concentration de fond d'acides nucléiques hôtes semblable aux taux prévus dans un échantillon de tissu.
Clone APC (alias Minigene^{MC})	Les normes relatives aux témoins positifs artificiels (APC) sont des constructions contenant l'entièreté de la séquence visée par chaque essai clonées dans un vecteur plasmidique pour permettre une production continue de matériaux de contrôle. On a utilisé des dilutions en série de témoins APC de concentration connue pour évaluer la sensibilité analytique de chaque essai – c'est-à-dire le nombre de copies minimal qui pourrait être détecté, ou la « limite de détection ».

Terme	Définition
Coefficient de concordance (CC) pour des variables continues	Le coefficient de concordance (Lin, 1989) est un degré de convergence entre les paires de résultats (pour l'ensemble des plateformes, des techniciens, des méthodes, etc.). Une courbe de concordance montre à quel point les résultats sont étroitement liés à une ligne avec une pente = 1 (angle de 45 degrés) qui passe à travers l'origine (ligne de concordance parfaite). Le CC (ρc dans l'équation suivante) contient un paramètre pour la précision (ρ) et l'exactitude (C_b). ρ est le coefficient de corrélation de Pearson, une mesure de la qualité de l'ajustement par rapport à la ligne (précision), et C_b est un facteur de correction de justesse qui indique à quel point la droite de meilleur ajustement dévie par rapport à la pente et l'origine, et c'est une mesure de l'exactitude. $\rho_c = \rho C_b$
Coefficient Kappa de Cohen pour les variables dichotomiques	Degré de convergence de la réussite/l'échec, des résultats sur la présence/l'absence qui s'ajuste en fonction du degré de convergence qui se produirait par hasard. Le coefficient Kappa va de 0 à 1, κ =0,20 indiquant une convergence très faible et κ = 1 indiquant une convergence parfaite.
Comparabilité	On l'utilise ici pour décrire la convergence entre les deux plateformes PCR quantitatives (BioMark et ABI 7900).
Contrôle plasmidique	Une sonde de contrôle « plasmidique » étiquetée dans NED a été multiplexée dans tous les essais pour assurer le suivi de la contamination de l'APC (même sonde pour tous les essais).
Courbe ROC	Fonction d'efficacité du récepteur (Receiver Operating Characteristic). On utilise des courbes ROC pour tracer la sensibilité d'un essai par rapport au taux de faux-positifs (1-Sp) calculé à plusieurs valeurs admissibles différentes; le laboratoire a utilisé la fonction d'efficacité du récepteur pour sélectionner la valeur de Ct admissible appropriée pour faire la distinction entre les animaux infectés et non infectés. Comme les chercheurs ne connaissaient pas l'état pathologique des animaux sur lesquels on avait prélevé les échantillons, ils ont évalué la convergence entre les deux plateformes en attribuant artificiellement un état « infecté » fixé à quatre valeurs de Ct admissibles (25, 30, 35 et 40) pour classer les échantillons ABI 7900 dans la catégorie réussite/échec. On a utilisé l'analyse non paramétrique de la fonction d'efficacité du récepteur pour déterminer la valeur de Ct optimale sur BioMark pour une convergence maximale, tel que déterminé par la surface sous la courbe ROC la plus élevée avec la valeur de spécificité la plus élevée.
Ct	Le cycle seuil où la fluorescence dépasse les teneurs de fond naturelles observées dans le témoin sans matrice et où une croissance exponentielle du produit PCR s'ensuit. Des valeurs de Ct inférieures indiquent des charges d'échantillons plus élevées.

Terme	Définition
Dynamic Array[MC]	La « puce » au format 96.96 qui est exécutée sur la plateforme BioMark. Les puces Dynamic Array sont disponibles pour 96 essais x 96 échantillons (96.96), 48 essais x 48 échantillons (48.48), 24 essais x 192 échantillons (24.192), et 6 grilles x 12 essais x 12 échantillons (6.12.12).
Efficacité de l'amplification	Dans un essai idéal, la quantité de séquence cible (amplicon) double après chaque cycle (augmentation exponentielle). L'efficacité de l'amplification est une mesure de la proximité du taux d'amplification par rapport à l'idéal exponentiel. Elle est déterminée en créant une courbe standard (valeur de Ct par rapport à la concentration logarithmique) pour une série de dilutions au 1/10 de la norme. La courbe standard peut être utilisée pour déterminer la gamme dynamique (plage de mesure utilisable) de l'essai et pour calculer la pente et l'efficacité de l'essai en termes de coefficients r et R^2. L'efficacité de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est calculée au moyen de l'équation suivante : $E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$; idéalement, l'efficacité devrait se situer entre 90 et 110 % et la pente d'une courbe standard devrait être de −3,32, avec $R^2 > 0,985$.
Essai de PCR quantitative TaqMan[MC]	« La composition chimique de l'hydrolyse en 5' utilise deux amorces, une sonde, et l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase Taq. La sonde à ADN est non extensible et étiquetée avec un colorant rapporteur fluorescent et un extincteur qui sont conservés très près l'un de l'autre tant que la sonde est intacte. Une fois que les amorces et la sonde s'hybrident à la cible et que les amorces commencent leur extension, l'activité exonucléasique de la polymérase pendant l'extension va provoquer l'hydrolyse de la sonde et la connexion entre le rapporteur et l'extincteur va se rompre; cela permet au rapporteur de devenir fluorescent. Étant donné que les trois composantes, à savoir les deux amorces et une sonde, doivent toutes s'hybrider à la cible, cette méthode entraîne une plus grande précision et une plus grande spécificité du produit de PCR amplifié que les amorces seules (comme dans la réaction en chaîne de la polymérase avec l'agent SYBR). De plus, différentes sondes peuvent avoir différents fluorophores qui permettront la détection simultanée de plusieurs transcriptions dans une seule réaction. » Source : Integrated DNA Technologies
EV	Espèces voisines. Celles-ci ont été définies dans le présent rapport comme des espèces dont les séquences affichent un degré d'homologie de plus de 90 % par rapport à l'espèce ciblée. À l'occasion, toutes les espèces au sein d'un genre ont été considérées comme des espèces voisines, même s'il y avait une homologie inférieure à 90 %.
EVAgreen[MC]	Une molécule rapporteuse qui rayonne lorsqu'elle se lie à de l'ADN double brin. La liaison n'est pas propre à la séquence.
FAM[MC]	Fluorophore avec un niveau d'émission maximal établi à 518 nm.

Terme	Définition
gBlock[MC]	Constructions d'ADN synthétiques de 1 000 paires de bases produites pour l'analyse de la spécificité analytique de souches ou d'espèces pour lesquelles de « vrais » témoins sous la forme d'échantillons de tissu, de lignées cellulaires ou de cultures bactériennes n'étaient pas disponibles.
IC	Intervalle de confiance
ISO	Organisation internationale de normalisation.
LD	La limite de détection est une mesure de la sensibilité analytique. La limite de détection est l'estimation de la quantité d'analyte dans une matrice précisée qui produirait un résultat positif au moins pour un pourcentage de temps précisé. Habituellement, l'estimation de la LD sera fondée sur le procédé par ajout connu de l'analyte dans la matrice cible. Les valeurs calculées ont été obtenues à partir des concentrations mesurées de la dernière dilution avec une détection d'au moins 95 %.
LGM	Laboratoire de génétique moléculaire à la Station biologique du Pacifique dirigé par Kristi Miller, Ph.D. et où l'on a réalisé les analyses de laboratoire.
LHT	La limite de concordance peut être déterminée au moyen d'un graphique de Bland-Altman. Bland et Altman indiquent que lorsque la différence des deux mesures couplées est tracée par rapport à la moyenne des deux mesures, 95 % des mesures devraient se trouver dans les limites de ±2 écarts-types de la différence moyenne.
Minigenes[MC]	Même définition que les clones APC
MPO	Pêches et Océans Canada
NED[MC]	Fluorophore avec un niveau d'émission maximal établi à 575 nm. Dans cette étude, la sonde avec témoin positif artificiel (APC) a été étiquetée avec NED[TM].
NRP	Un essai avec témoin négatif sans amorces ni sondes ajoutées.
OIE	Organisation mondiale de la santé animale (appelé auparavant l'Office international des épizooties, ou OIE)
Plateforme Mx3005	Plateforme PCR quantitative utilisée par le PNSAA
PNE	Procédure normale d'exploitation.
PNSAA	Programme national sur la santé des animaux aquatiques
Pr(divergence)	Probabilité de divergence estimative

Terme	Définition
Réaction faussement négative	Un résultat négatif (produit fluorescent non détectable) au cours d'un essai de PCR quantitative TaqMan d'un échantillon pour analyse obtenu à partir d'un échantillon réputé contenir le gène cible. Il peut être dû à un manque de sensibilité analytique, à une spécificité analytique restreinte, ou à une dégradation de l'échantillon.
Réaction faussement positive	Un résultat positif (produit fluorescent détectable) au cours d'un essai de PCR quantitative TaqMan où le gène cible n'est pas réputé présent. Il peut découler de la réactivité croisée d'espèces pathogènes voisines, de la contamination croisée de l'échantillon pour analyse ou de réactions non spécifiques, p. ex., une dégradation de sonde entraînant une fluorescence.
Répétabilité	Convergence entre des réplicats d'échantillons, à la fois dans le cadre d'une série d'épreuves et entre des essais indépendants. Par exemple, deux résultats tirés de la même puce exploitée par un technicien à partir d'un plateau d'échantillons d'ARN.
Reproductibilité	Convergence de résultats entre les séries d'épreuves. Par exemple, convergence entre deux résultats tirés d'une série d'épreuves menées sur des échantillons par deux techniciens à partir de deux extractions d'ARN sur deux tableaux dynamiques.
RFTS	Syndrome des alevins de la truite arc-en-ciel causé par l'agent pathogène *Flavobacterium psychrophilum*.
SCCS	Secrétariat canadien de consultation scientifique
Sensibilité analytique	Nombre minimal de copies de la séquence génétique cible détectée de façon fiable par l'essai de PCR quantitative. Habituellement, la sensibilité est exprimée comme la limite de détection (LD), qui est la concentration pouvant être détectée avec une certitude raisonnable (on utilise une probabilité de 95 % ici). Les résultats expérimentaux inférieurs à la LD théoriquement possible doivent être déclarés comme inférieurs à la LD. On utilise également le terme « sensibilité » dans les analyses de spécificité, mais dans ce cas, il définit le pourcentage de fois que des échantillons de vrais positifs ont été détectés, ou l'« inclusivité » de l'essai. Dans ce cas, les essais montrant une « sensibilité » inférieure à 100 % peuvent ne pas amplifier toutes les souches connues, ou certains échantillons témoins positifs peuvent être des concentrations inférieures à la limite de détection.
SNG	Séquençage de nouvelle génération
Sonde APC	Une séquence de sonde supplémentaire a été ajoutée à chaque clone APC, ce qui a permis une surveillance continue des témoins positifs artificiels dans toutes les réactions de qPCR. La sonde APC universelle (qui est la même pour tous les essais) a été étiquetée dans NED^{MC}. On a réglé le BioMark pour détecter à la fois les valeurs FAM (la sonde propre à chaque essai) et NED simultanément.

Terme	Définition
Sonde TaqMan[MC]	On utilise les sondes TaqMan pour augmenter la spécificité d'un essai de PCR quantitative (voir ci-dessous). Le laboratoire de recherche a utilisé des sondes TaqMan® personnalisées MGB d'Applied Biosystems®, qui intègrent un colorant rapporteur placé en 5' et un extincteur non-fluorescent placé en 3' (NFQ); le groupement MGB (Minor Groove Binder – ligand du petit sillon) est attaché à la molécule de l'extincteur. L'extincteur non-fluorescent offre l'avantage d'un signal de fond plus faible, qui entraîne une meilleure précision dans l'analyse quantitative. Le fragment MGB stabilise la sonde hybridisée et élève efficacement la température de fusion (Tm). Source : Life technologies
Spécificité analytique	La mesure dans laquelle l'essai ne détecte pas (n'amplifie pas) d'autres microbes non visés liés du point de vue phylogénétique. Cette mesure est déterminée de façon empirique en comparant les données de séquence des nucléotides disponibles pour l'espèce ciblée et les espèces voisines (dans une analyse in silico) et en menant l'essai de PCR quantitative conçu pour la cible avec des échantillons positifs authentiques. Les échantillons positifs peuvent être des tissus de poissons contaminés, une culture d'agents pathogènes pure, ou des séquences génétiques synthétiques faites sur commande (gBlocks[MC]).
SSC	Surface sous la courbe. - voir courbe ROC
SSU	Séquences d'ARN ribosomique de la petite sous-unité
STA	Amplification spécifique cible. Le tableau dynamique 96.96 utilise un volume de chargement des échantillons de 5 µl, et il distribue ce mélange d'échantillons à travers 96 cuves de réaction dans des aliquotes de 7 nl. Avec ces microvolumes, la détection des cibles spécifiques requiert un minimum de 500 à 1 000 copies par µl dans l'échantillon chargé dans le tableau pour veiller à ce qu'au moins une copie soit présente dans chaque puits. L'amplification spécifique cible est une réaction en chaîne de la polymérase (PCR) multiplexe utilisant $1/10^e$ de la concentration normale de toutes les amorces (aucune sonde) cyclée 14 fois (dans une machine de PCR normale) pour augmenter la concentration cible de 1 000 x. Les amorces sont retirées de l'amplification spécifique cible (STA) avant de charger les échantillons sur le tableau dynamique; par conséquent, les amplifications sur le BioMark sont simplexes. Il s'est avéré que cette méthode n'avait pas d'impact négatif sur l'analyse quantitative cible.
SYBR[MC]	Colorant intercalant fluorescent utilisé pour l'ADN, avec un niveau d'émission maximal à 523 nm.

Terme	Définition
Valeur de Ct admissible (valeur seuil)	La valeur seuil de Ct ci-dessus à laquelle on considère que les échantillons sont « négatifs » pour l'analyte de microbes. Ici, on a déterminé la valeur de Ct sur BioMark pour une convergence maximale entre les plateformes PCR quantitatives en tant que surface sous la courbe ROC la plus élevée avec la valeur de spécificité la plus élevée. Le laboratoire a également utilisé la limite de détection de la valeur de Ct, définie comme la valeur de Ct maximale par laquelle on détecte au moins 95 % des positifs connus de façon répétée.
VIC[MC]	Fluorophore avec un niveau d'émission maximal établi à 554 nm.

SOURCES DE RENSEIGNEMENTS

Le présent avis scientifique découle du processus consultatif national qui a eu lieu du 2 au 4 décembre 2014 concernant l'Examen de l'évaluation de la plateforme BioMark de Fluidigm pour déterminer son adéquation pour la surveillance microbienne. Le document de recherche et le compte rendu découlant de cette réunion seront publiés, lorsqu'ils seront disponible, sur le calendrier des avis scientifiques du secteur des Sciences du MPO.

CE RAPPORT EST DISPONIBLE AUPRÈS DU :

Secrétariat canadien de consultation scientifique
Région de la capitale nationale
Pêches et Océans Canada
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

Téléphone : 613-990-0293
Courriel : csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca
Adresse Internet : www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/

ISSN 1919-5117
© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, 2015

La présente publication doit être citée comme suit :

MPO. 2015. Avis scientifique visant à orienter la recherche au moyen de la plateforme BioMark de Fluidigm® pour détecter les microbes chez les saumons d'élevage et sauvages. Secr. can. de consult. sci. du MPO, Avis sci. 2015/039.

Also available in English:

DFO. 2015. Science Advice to Guide a Research Study using the Fluidigm® Biomark Platform for Microbe Detection in Wild and Farmed Salmon. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Sci. Advis. Rep. 2015/039.